

Über die Isolierung von Flavonen
aus gerbstoffhaltigen Drogen
durch Polyamidsäulenchromatographie

José Izquierdo

1958

Über die Isolierung von Flavonen aus gerbstoffhaltigen Drogen durch Polyamidsäulenchromatographie

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
José Izquierdo
aus
Valencia/Spanien

Mai 1958



1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Hörhammer

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1958

Sonderdruck aus
„Archiv der Pharmazie“

291./63. Band, Heft 6, Seite 269—273

Verlag Chemie G. m. b. H., Weinheim/Bergstraße

1671. L. Hörhammer, H. Wagner, J. Izquierdo und H. Endres

**Isolierung eines Gallussäuremethylesters aus Cotinus
Coggygia Scop. (*Rhus cotinus* L.) durch Chromatographie
an Polyamid*)**

Aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

Direktor: Prof. Dr. L. Hörhammer

und dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

Direktor: Prof. Dr. W. Grassmann

(Eingegangen am 30. Januar 1958)

Eine papierchromatographische Untersuchung methanolischer Auszüge verschiedener Cotinus- und Rhus-Arten ergab, daß diese neben dem von W. Grassmann und Mitarbeitern¹⁾ aus *Rhus coriaria* und *Rhus typhina* isolierten Gallussäuretetrasaccharid (I) noch eine zweite Eisenchlorid-färbende Verbindung (II) enthalten. Die Substanz liegt mit einem R_f -Wert von 0,80**) höher als I ($R_f = 0,63$), sie ist im Gegensatz zu I durch Azeton nicht extrahierbar und liefert bei der Hydrolyse ebenfalls Gallussäure.

Zur Isolierung von II gingen wir von Cotinus-Coggygia-Blättern aus. In dem methanolischen Extrakt waren die beiden Gallussäure-Derivate und drei Flavone nachweisbar. Eine Trennung der beiden ersten gelang durch Vorfraktionierung des in Wasser aufgenommenen Extraktes mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Äther und Benzin. Substanz II ging quantitativ in die organische Phase über, während Substanz I im wäßrigen Extrakt verblieb. Um auch die flavonischen Bestandteile abzutrennen, benutzten wir das chromatographische Verfahren an einer Polyamidsäule (Perlon), das bereits bei der Auftrennung eines Fichtenrinden-gerbstoffes²⁾ mit Erfolg benutzt worden war. Für 7,7 g Mischkristallinat wählten wir eine Säule von 36 cm Füllhöhe und 6 cm Durchmesser. Eluiert wurde nacheinander mit Wasser, Wasser-Methanol, Methanol und einem Methanol-Azeton-Gemisch und das Gesamteluat auf Grund der Eisenchloridreaktion, des Zirkon-oxychloridtestes und nach einer papierchromatographischen Prüfung in zwölf Fraktionen unterteilt. Substanz II fand sich nahezu quantitativ in der ersten Fraktion, braun gefärbte Verunreinigungen verblieben in den Fraktionen 2 bis 9, während die Flavone in den Fraktionen 9 mit 11 erschienen. In einem zweiten Arbeitsgang gelang die Isolierung von II auch ohne vorherige Extraktion mit einem Äther-Benzingemisch.

*) Herrn Prof. Dr. L. Brauner, Direktor des Botanischen Instituts d. Univ. München, zum 60. Geburtstag gewidmet.

**) Lösungsmittelsystem: Butanol-Eisessig-Wasser (4 + 1 + 5).

¹⁾ W. Grassmann, G. Stiefenhofer und H. Endres, Chem. Ber. 89, 454 (1956).

²⁾ W. Grassmann, H. Endres, W. Pauckner und H. Mathes, Chem. Ber. 90, 1125 (1957).

Die leichte Eluierbarkeit von Substanz II deutete darauf hin, daß das Molekül nur wenige, zur Wasserstoffbrückenbildung befähigte Gruppen enthielt. Verglichen mit der Laufgeschwindigkeit der Flavone aus demselben Rhus-Extrakt und in Übereinstimmung mit den von *W. Grassmann*³⁾ für einfache Phenole und von *L. Hörhammer*⁴⁾ für Flavone gefundenen Gesetzmäßigkeiten bei der Chromatographie an Polyamid, waren für II höchstens drei phenolische Gruppen zu postulieren. Diese Vermutung hat sich, wie aus dem folgenden ersichtlich ist, voll und ganz bestätigt. Die Chromatographie an Polyamid gestattet demnach bei Stoffen mit Wasserstoffbrücken-ausbildenden Substituenten eine wesentlich genauere Vorhersage über Zahl und Anordnung funktioneller Gruppen, als dies auf Grund ihres Verhaltens an Adsorbentien oder bei der Verteilung zwischen zwei Phasen möglich ist.

Nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser resultierten aus der ersten Fraktion 3,8 g einer bei 198–200° C schmelzenden weißen Substanz. Wir hydrolysierten mit Schwefelsäure und isolierten aus der Ätherausschüttelung schmelzpunktreine Gallussäure (Smp. 235–240° C). Auf Grund der Molekulargewichtsbestimmung (Molekulargewicht nach Rast = 184) schied eine Zugehörigkeit zur Gruppe der Galloktechine aus. Die Differenz von 184 zu 170 (Mol.-Gew. der Gallussäure) wurde durch eine Methoxylgruppe (Mikro-Zeisel) erklärt.

Zusammenstellung der Analysenwerte:

	gef.	ber.
C	51,86%	52,10%
H	4,34%	4,35%
OCH ₃	17,0%	16,84%
Molekulargewicht nach Rast	184	184,0
Esterzahl	309	305

Die Entscheidung ob Ester- oder Äthermethoxyl war durch die leichte Hydrolysierbarkeit mit Säure und die quantitativ verlaufene Tannasespaltung gegeben. Zum Nachweis des Methylesters wurde die Substanz mit Kalilauge verseift, der gebildete Methylalkohol mit Wasserstoffsuperoxyd oxydiert und als Formaldehyd mit Schiffs Reagenz nachgewiesen. Der isolierte Ester stimmte im Schmelzpunkt, UV-Spektrum und IR-spektroskopisch (Abb. 1 und 2) mit dem von uns dargestellten Gallussäuremethylester überein.

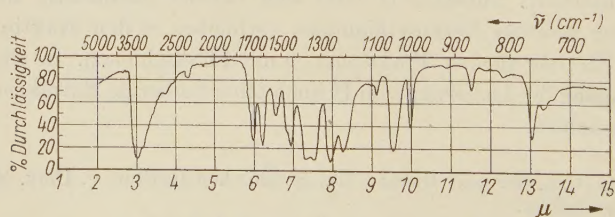


Abb. 1. IR-Spektrum von Gallussäuremethylester isoliert

³⁾ *W. Grassmann, H. Hörmann und A. Hartl, Makromolekulare Chem. 21, 37 (1956).*

⁴⁾ *L. Hörhammer, H. Wagner und W. Leeb, Naturwissenschaften 44, 513 (1956).*

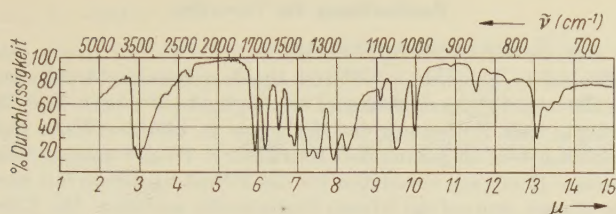


Abb. 2. Spektrum von Gallussäuremethylester synthetisiert.

Bei den anderen *Rhus*- und *Cotinus*-Arten, die laut Chromatogramm ebenfalls diesen Ester enthalten, handelt es sich um *Cotinus obovatus* Raf. (*C. americanus* Nutt.), *Cotinus Coggygia* Scop., var. *purpureus* (Dupuy-Jamin), *A. Rehd. u. cult. rubra* (hort. bot. mon.), *Rhus trilobata* Nutt., *Rhus oxyacantha* Cav., *Rhus toxicodendron* L., *Rhus typhina* L. und *Rhus glabra* L.*). Über die Auftrennung und Identifizierung der Flavone berichten wir in einem anderen Zusammenhang.

Diskussion

Ein Gallussäuremethylester wurde bisher nur aus den Früchten von *Caesalpinia brevifolia* (Caesalpiniaceae)⁵⁾ und *Juglans regia* (Juglandaceae)⁶⁾, ferner aus einem Vertreter der Geraniaceae⁷⁾, der Euphorbiaceae⁸⁾ und der Sapindaceae⁹⁾ isoliert. Die Isolierung auch aus *Cotinus Coggygia* und der papierchromatographische Nachweis in anderen Arten der gleichen Familie zeigt, daß dieser Ester im Pflanzenreich weiter verbreitet ist als früher angenommen wurde. Nachdem *H. Erdtmann*¹⁰⁾, *J. Herzig*¹¹⁾ und kürzlich auch *D. E. Hathaway*¹²⁾ in Modellversuchen zeigen konnten, daß nur Gallussäureester, nicht aber Gallussäure selbst unter bestimmten Bedingungen über Hexaoxydiphensäure als Zwischenglied zu Ellagsäure dehydrierbar sind und andererseits Ellagsäure in der Pflanze meistens mit Gallussäuremethylester zusammen auftritt, darf angenommen werden, daß dieser Weg auch in der Pflanze beschritten wird. Zu ähnlichen Befunden kam auch *W. Günther*¹³⁾ bei seinen Studien über Corilagin, das er als den Diester einer Hexaoxydiphensäure identifizieren konnte. Es ist nicht ausgeschlossen, daß der Gallussäuremethylester darüber hinaus auch beim Aufbau anderer höher molekularer Gallotannine eine wichtige Rolle spielt.

* Wir danken Herrn Dr. Dr. *Heino Heine*, Botanisches Institut der Universität München, für die Bestimmung der einzelnen Subspezies.

⁵⁾ *M. Nierenstein*, *Collegium* [Haltingen] 162, 197 (1905).

⁶⁾ *L. Jurd*, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 3445 (1956).

⁷⁾ *H. Huzikawa* und *M. Ina*, *J. pharmac. Soc. Japan* 60, 125 (1940); *F. Fujikawa*, *J. Nakamura* und *K. Asami*, *J. pharmac. Soc. Japan* 62, 343 (1942).

⁸⁾ *K. Huzii*, *H. Huzikawa* und *Y. Kudo*, *J. pharmac. Soc. Japan* 57, 140 (1937).

⁹⁾ *H. J. Carlson*, *P. Olynky*, *H. Duncan* und *A. Smolin*, *Antibiot. u. Chemother.* 1, 431 (1951).

¹⁰⁾ *H. Erdtmann*, *Svensk kem. Tidskr.* 47, 230 (1935).

¹¹⁾ *J. Herzig*, *J. Pollak* und *M. v. Bronneck*, *Mh. Chem.* 29, 277 (1908).

¹²⁾ *E. Hathaway*, *Biochem. J.* 67, 445 (1957).

¹³⁾ *W. Günther*, Dipl.-Arbeit, Universität Heidelberg, 1955.

Beschreibung der Versuche

1. Isolierung des Gallussäuremethylesters

1,5 kg luftgetrocknete, geschnittene Blätter aus dem Botanischen Garten, München*), wurden im Soxhlet mit 90%igem Methanol erschöpfend extrahiert. Die Abtrennung des Chlorophylls erfolgte nach Entfernung des Methanols in üblicher Weise durch Aufnahme des bis zur Sirupkonsistenz eingedampften Extraktes in Wasser und anschließende Filtration. Für die weitere Reinigung versetzten wir das Filtrat wiederum mit einem Überschuß an destilliertem Wasser, worauf die letzten Ballaststoffe ausfielen. Die Lösung ließen wir über Nacht im Eisschrank stehen und zentrifugierten vom Rückstand ab. Zur Trennung von II und I wurde der wässrige Extrakt mit einem Äther-Benzin-Gemisch (1 : 1) so lange ausgeschüttelt, bis papierchromatographisch keine Substanz II im wässrigen Rückstand nachweisbar war. Die Gesamtmenge des Äther-Benzin-Gemisches betrug 1,5 l. Nun wurde abdestilliert, der Rückstand gesammelt und bei 90° getrocknet. Für die Abtrennung der Flavone verwendeten wir eine Säule mit 36 cm Polyamidfüllhöhe und 6 cm Durchmesser. 220 g Perlonpulver, fein, Maschenweite 0,2 mm (DIN 30) der Farbwerke Hoechst (Werk Bobingen) ließen wir 2 bis 3 Stunden in Wasser quellen und schlämmten anschließend den Brei in kleinen Portionen in die Glassäule, die am unteren Ende mit einer Glasfritte und einer Lage Watte versehen war. Vor dem Auftragen der Substanz wuschen wir mit etwa $\frac{1}{2}$ l Wasser nach bis die Eluate frei von Schwebeteilchen abtropften. Nun lösten wir 7,7 g des Kristallisates in 25 ml Methanol und trugen mit einer Pipette auf die Säule auf. Bei einer Abtropfgeschwindigkeit von 2,5 ml pro Minute passierten im Verlauf von 3 Tagen nacheinander 7 Lösungsmittel bzw. -gemische die Säule: 1. destilliertes Wasser, 270 ml, 2. Wasser-Methanol-Gemisch 4 : 1, 900 ml, 3. Wasser-Methanol-Gemisch 3 : 2, 450 ml, 4. Wasser-Methanol-Gemisch 1 : 1, 900 ml, 5. Wasser-Methanol-Gemisch 1 : 3, 10,9 l, 6. Methanol, 7,7 l, 7. Azeton-Methanol 1 : 1, 10 l. Der Lösungsmittelwechsel erfolgte jeweils dann, wenn die Flavonzonen mit einem der Lösungsmittel keine wesentliche Wanderungsgeschwindigkeit mehr in der Säule hatten. Die Testung der einzelnen Fraktionen erfolgte 1. mit 2%iger methanolischer Zirkonoxychloridlösung, 2. mit 2%iger äthanolischer Eisenchloridlösung und 3. papierchromatographisch im System Butanol-Eisessig-Wasser (4 + 1 + 5); Sprühreagenzien: 5%iges Aluminiumchlorid und 2%ige äthanolische Eisenchloridlösung. Eluatfraktion I wurde zur Trockene eingedampft und die hierbei resultierende Substanz (3,8 g) aus heißem Wasser bis zur Schmelzpunktskonstanz umkristallisiert (Schmp. 198—200° C).

2. Säurehydrolyse

250 mg Substanz wurden mit 50 ml 2,5%iger Schwefelsäure 2 Stunden am Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten extrahierten wir die Hydrolyselösung mehrmals mit je 50 ml Äther, brachten den Äther zur Trockene und kristallisierten die zurückbleibende Substanzmenge aus heißem Wasser um (Schmp. 235—240° C, R_f -Wert in Butanol-Eisessig-Wasser 0,80).

3. Enzymatische Hydrolyse

100 mg Substanz wurden in einer Reibschale mit 50 mg Tannase (Spaltwert 47), die nach einer Vorschrift von *Freudenberg* und *Vollbrecht*¹⁴⁾ aus *Aspergillus niger* hergestellt worden war, vermischt und mit 20 ml Wasser zu einem Brei verrührt. Die Inkubation erfolgte bei 30° C unter öfterem Umschütteln. Nach 3 Tagen wurde die Lösung in gleicher Weise wie unter 2. mit Äther extrahiert und der Rückstand papierchromatographisch untersucht.

*) Wir danken Herrn Professor Dr. L. Brauner, Direktor des Botanischen Gartens, München, für die Überlassung des Pflanzenmaterials.

¹⁴⁾ Collegium [Darmstadt] 468 (1921) u. 398 (1927).

4. Bestimmung der Esterzahl

0,9846 g Ester wurde mit 25 ml $\frac{1}{2}$ n weingeistiger KOH ($F = 1,002$) am Rückfluß 1 Stunde verseift. Zur Rücktitration waren 14,20 ml $\frac{1}{2}$ n HCl ($F = 1,0$) nötig, was einem Verbrauch von 10,80 ml KOH entsprach. Die Esterzahl errechnete sich nach der Gleichung

$$x = \frac{10,80 \cdot 1,002 \cdot 28,055}{0,9846} \text{ zu } 309. \text{ Esterzahl authentischen Gallussäuremethylesters} = 305.$$

5. Nachweis des Methylesters

2 ml der nach 4. erhaltenen alkalischen Lösung wurden mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit Äther extrahiert, die wässrige Lösung anschließend mit 2 ml 3%igem Wasserstoffsuperoxyd versetzt und 5 Minuten lang erhitzt. Auf Zusatz von 2 ml Schiffs-Reagens (fuchsin-schweflige Säure) entstand die für Formaldehyd typische Rotfärbung.

6. Synthese des Gallussäuremethylesters

8 g Gallussäure wurden mit 20 ml Methylalkohol und 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure 10 Stunden am Rückfluß zum Sieden erhitzt, über Nacht stehen gelassen, hierauf der Methylalkohol abdestilliert, der Rückstand mit 10 ml kaltem Wasser vermischt, abfiltriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Umkristallisation aus heißem Wasser. Schmp. = 235–240° C.

7. Spektren

Die UV-Messung erfolgte im Unicam-Quarzspektrophotometer SP 500 in methanolischer Lösung bei einer Schichtdicke von 1 cm Konzentration = 1,2 mg/100 ml. Maximum_I = 220 m μ ($\log \epsilon = 4,36$), Maximum_{II} = 275 m μ ($\log \epsilon = 4,00$).

Aufnahme des IR-Spektrums mit einem Leitz-Gerät; Konzentration 1 mg/150 mg KBr.

8. Papierchromatographie

Chromatographiert wurden äthanolische Extrakte der einzelnen Drogen auf Schleicher & Schüll-Papier 2043b GL in den Systemen (a) Butanol-Eisessig-Wasser (4 + 1 + 5) und (b) Isopropanol-Eisessig-Wasser (7 + 1 + 2) absteigend. Sprühreagenzien: 2%ige äthanolische Eisenchloridlösung zum Nachweis der Gallussäurederivate und 5%ige Aluminiumchloridlösung zum Nachweis der Flavone. R_f -Wert des Gallussäuremethylesters in (a) = 0,80, in (b) = 0,17.

Wir danken Herrn Dr. I. Ugi, Organisch-Chemisches Institut der Universität München (Direktor: Prof. Dr. R. Huisgen) für die Aufnahme der IR-Spektren, ferner Herrn Dr. Möller, Farbwerke Hoechst, Werk Bobingen, für die Überlassung des Perlompulvers.

Anschrift: Prof. Dr. L. Hörhammer, Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre, München 2, Karlstraße 29.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Lebenslauf

Am 19. Dezember 1919 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. José Izquierdo Sánchez und seiner Ehefrau Angeles Sorli Julve in Valencia (Spanien) geboren. Von 1926 bis 1931 besuchte ich dort die Elementarschule; darauf legte ich die Aufnahmeprüfung für die Bakkalaureatslehrgänge ab, die ich im „Instituto de Segunda Ensenanza, Blasco Ibáñez, Valencia“ von 1931 bis 1936 besuchte.

Wegen des spanischen Bürgerkrieges von 1936 bis 1939 konnte ich den „Título de Bachiller“ (= dem deutschen Reifezeugnis) erst im Jahre 1940 erlangen. Im gleichen Jahre immatrikulierte ich mich an der Universität Barcelona und studierte dort in der pharmazeutischen Fakultät bis zum Jahre 1946; nach Beendigung des Studiums erhielt ich den „Título de Licenciado en Farmacia“ (= dem deutschen pharmazeutischen Staatsexamen und der Approbation). Während dieser Jahre besuchte ich Abendkurse für die deutsche Sprache am Deutschen Kulturinstitut in Barcelona. Nach Abschluß meiner Hochschulausbildung kehrte ich nach Valencia zurück, wo ich von 1946 bis 1948 als Praktikant im pharmazeutischen Laboratorium „Gamir“ tätig war und in der „Facultad de Ciencias“ unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Francisco Bosch studierte. Von 1948 bis Juli 1954 arbeitete ich im Laboratorium „Huoriz“ in Lérida. Im August des Jahres 1953 nahm ich an dem einmonatigen Ferienkurs für Ausländer, der von der Universität München geleitet wurde, teil. Ich blieb bis zum 1. November 1953 in Deutschland, um meine deutschen Sprachkenntnisse zu vertiefen.

Im Juli 1954 kehrte ich wieder nach München zurück und befasse mich seit Oktober 1954 unter Leitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer mit der Durchführung der vorliegenden Dissertationsarbeit am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

